

М. Н. ХОДОСОВСКИЙ, В. В. ЗИНЧУК

## УЧАСТИЕ ГАЗОТРАНСМИТТЕРОВ В КИСЛОРОДЗАВИСИМЫХ ПРОЦЕССАХ ПРИ СИНДРОМЕ ИШЕМИИ–РЕПЕРФУЗИИ ПЕЧЕНИ

Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь

Ишемическое–реперфузионное повреждение печени является важной причиной ранней дисфункции и смертности в клинической практике после резекций и трансплантации органа. Окислительный стресс, нарушения механизмов транспорта кислорода, воспаление, дисфункция митохондрий, апоптоз и некроз являются важнейшими патофизиологическими механизмами реперфузионных повреждений печени. Молекулы трех газов: сероводорода, монооксида углерода и монооксида азота могут оказывать широкий спектр эффектов на механизмы транспорта кислорода, митохондриальное дыхание, процессы воспаления и апоптоза при ишемии–реперфузии печени. Целью данного обзора был анализ собственных и литературных данных о влиянии газотрансмиттеров на механизмы реперфузионных повреждений печени.

*Ключевые слова:* газотрансмиттеры, кислород, гемоглобин, печень, ишемия–реперфузия

**Введение.** Синдром ишемии–реперфузии печени (ИРП) – ключевой патофизиологический механизм дисфункции данного органа после трансплантации, лобэктомии, а также геморрагического шока с последующим восстановлением потерянной крови [23]. Ранняя дисфункция печеночного трансплантата является частым осложнением данной операции и составляет, по данным различных авторов, от 9,6% до 31,9% случаев, причем первичное не функционирование наблюдается с частотой от 0,9% до 7,2% , что в 50% случаев приводит к госпитальной смертности реципиентов [5, 23]. Механизм развития синдрома ИРП включает множество молекулярных путей и внутриклеточных процессов, таких как анаэробный метаболизм, редокс–состояние, ионный дисбаланс, повреждение митохондрий, индукция протеинкиназ, высвобождение цитокинов и хемокинов, активация клеток Купфера, нейтрофилов, лимфоцитов, дисфункция эндотелия, которые вовлекаются и тесно взаимодействуют друг с другом [35]. Окислительный стресс при синдроме ИРП носит ярко выраженный кислородзависимый характер, начинается с первых минут реперфузии и потенцируется большинством его патофизиологических механизмов [4]. Нарушение баланса между генерацией активных форм кислорода (АФК) и факторами антиоксидантной защиты создает условия для активации процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), ведущих, в конечном счете, к повреждению клеточных и субклеточных мембранных структур [44]. Кислородсвязывающие свойства крови могут существенно влиять на развитие окислительного стресса при ИРП, причем снижение сродства гемоглобина к кислороду (СГК) усиливает его, тогда как увеличение – ослабляет [4].

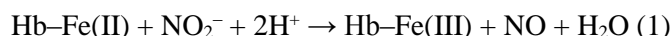
Открытие в последние годы биологических эффектов монооксида углерода (СО) и сероводорода (H<sub>2</sub>S) послужило толчком для исследования многих физиологических и патологических процессов с позиций новой концепции механизма межклеточной сигнализации, включавшей до этого классическую активацию через рецепторы или ионные каналы мембран [27]. Термин «газотрансмиттер» был введен для характеристики газов, которые действуют как высвобождаемые нейронами трансммиттеры. Монооксид азота (NO), СО и H<sub>2</sub>S объединены под понятием «газотрансмиттеры». Все они являются небольшими молекулами газов, свободно проходят через мембраны клеток и не взаимодействуют со специфическими мембранными рецепторами, синтезируются эндогенно с помощью ферментов. Их синтез может регулироваться организмом, они выполняют определенные специфические функции при физиологических концентрациях и их эффекты имеют свое специфическое клеточное и молекулярное предназначение. В настоящее время роль NO при синдроме ишемии–реперфузии печени является недостаточно ясной. С одной стороны, как вазодилататор – NO может улучшать процессы микроциркуляции, снижать миграцию и адгезию лейкоцитов и вызываемые ими повреждения органа при реперфузии [35]. С другой, как свободнорадикальная молекула, NO способен потенцировать окислительный стресс, образовывать мощные окислители (пероксинитрит), что может усугублять развитие окислительных повреждений

[2, 6]. Учитывая способность NO взаимодействовать с гемоглобином [34], представляется важным рассмотреть данный вопрос подробнее.

**Монооксид азота.** Транспорт газов кровью проявляется в переносе как O<sub>2</sub> и CO<sub>2</sub>, так и NO. Причем данный газотрансмиситтер диффундирует преимущественно внутрь эритроцитов. Оказавшись в просвете сосудов оксид азота мгновенно реагирует с HbO<sub>2</sub> (скорость реакции ~10<sup>7</sup> моль/с) с образованием метгемоглобина и NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. Однако биодоступность NO сохраняется благодаря его производным (нитрозогемоглобин, нитрозилгемоглобин) и имеет важное функциональное значение. Данные производные гемоглобина служат альтернативным источником образования NO в крови при его дефиците [2]. Установлено наличие собственных механизмов синтеза NO в эритроцитах, судя по накоплению конечных продуктов его метаболизма NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub>. Так, в 2006 г. P. Kleinbongard и соавторы выявили в эритроцитах особые протеины, расположенные на внутренней стороне плазматической мембраны и обладающие NO-синтазной активностью, сопоставимой с аналогичным ферментом в эндотелиальных клетках. Показано, что протеины с NO-синтазной активностью обеспечивает существенные регуляторные функции как для самих эритроцитов (изменение сродства к кислороду, деформируемости), так и для тромбоцитов, эндотелия и гладкомышечных клеток сосудов [53].

Активность NO-синтазы (EC:1.14.13.39) в эритроцитах, определяемая по специфическому превращению L-аргинина в цитруллин, составляет 0,3±0,1 пмоль/пг белка/мин, что сравнимо с активностью в культуре эндотелиальных клеток (0,7±0,1 пмоль/пг белка/мин) [41, 53]. Умеренная физическая нагрузка значительно увеличивает NO-синтазную активность эритроцитов за счет активации протеинкиназы B (Akt), что одновременно улучшает деформируемость форменных элементов крови [64], а значит и снабжение тканей кислородом. Улучшение деформируемости эритроцитов подтверждено в опытах при инкубации крови в течение 30 мин с розувастатином (20 нг/мл), что одновременно сопровождалось повышением активности эритроцитарной NO-синтазы (с 3,76±2,98 до 24,88±4,35 усл. ед., *p*<0,02) и концентрации нитритов в плазме (с 55,8±7,9 до 98,2±12,4 ммоль/л) [46]. Улучшение деформируемости эритроцитов происходит за счет S-нитрозилирования α- и β-спектрина форменных элементов крови [34].

Регуляция активности эритроцитарной NO-синтазы имеет ряд схожих механизмов с данным процессом в эндотелии. NO-синтазная активность эритроцитов также зависит от внутриклеточной концентрации кальция и фосфорилируется с помощью фосфатидилинозитол-3-киназы. Однако из-за отсутствия в красных кровяных клетках ядра, эндоплазматического ретикула и комплекса Гольджи, механизмы активации фермента, расположенного вблизи липидных рафт на внутренней поверхности мембран, значительно ограничены. Установлено, что продукция NO эритроцитами резко возрастает при добавлении в среду L-аргинина (субстратный механизм) [41]. В целом, механизм активации эритроцитарной NO-синтазы представляется следующим образом: повышение давления сдвига на мембрану эритроцита приводит к открытию кальциевых каналов и увеличению его внутриклеточной концентрации, последний, взаимодействуя с кальмодулином, повышает его аффинитет к эритроцитарной NO-синтазе и ослабляет ингибирующие влияния кавеолина-1 и флотиллина, что и активирует фермент. Снижение внутриэритроцитарной концентрации Ca<sup>2+</sup> приводит к ослаблению связи с кальмодулином и повышению взаимодействия с кавеолином-1 и флотиллином, ингибируя активность эритроцитарной NO-синтазы [53]. Альтернативный механизм повышения ее активности заключается во взаимодействии ацетилхолина с поверхностными рецепторами мембран эритроцитов и последующим фосфорилированием серина в положении 1177 под влиянием фосфатидилинозитол-3-киназы [26]. Кроме того, показано, что образование NO в эритроцитах может происходить путем восстановления нитритов с помощью гемоглобина (неферментативный механизм) [24].



Данная реакция может иметь огромное функциональное и физиологическое значение, так как наряду с высвобождением NO идет устранение двух протонов водорода, что крайне важно для компенсации ацидоза при ишемии. Показано, что неферментативный путь синтеза NO эритроцитами в ответ на гипоксию значительно усиливается в эритроцитах при сердечно-сосудистой патологии, когда одновременно нарушена их деформируемость [34]. При этом отмечается снижение активности эритроцитарной NO-синтазы при углублении гипоксии у таких пациентов. Возможно неферментативное восстановление нитритов в NO у эритроцитов с плохой деформируемостью

выполняет роль компенсаторного механизма по увеличению доставки кислорода тканям за счет образования нитрозилированного гемоглобина (Hb-Fe(II)NO) и снижения СГК.

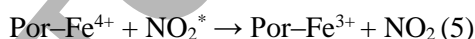


При этом биодоступность NO сохраняется, так как реакция является обратимой. Образование Hb-Fe(II)NO стабилизирует Т-конформацию гемоглобина и уменьшает СГК [24], что особенно важно для тканей, испытывающих дефицит кислорода. В капиллярах легких при оксигенации гемоглобина NO теряет электрон и перемещается на β-глобиновую цепь, соединяется с цистеином 93, образуя S-нитрозогемоглобин (SNO-Hb) [53]. Высвобождение NO из эритроцита идет с участием анион-обменного белка-1, который, соединяясь с SNO-Hb, способствует высвобождению NO наружу и, одновременно способствует деоксигенации гемоглобина [54]. Такая внутриклеточная кислородзависимая природа образования и высвобождения NO способствует гипоксической вазодилатации в микроциркуляторном русле [67]. Перестройка третичной структуры гемоглобина и модификация железопорфирина, вызванные присоединением NO, обуславливают конформационные изменения апобелка в областях ближайшего белкового окружения гема и субъединичных контактов, ослабление кооперативных взаимодействий в тетрамерах, уменьшая СГК [24]. Участие NO в R/T конформационных переходах гемоглобина в процессе циркуляции крови делают данный газ аллостерическим регулятором СГК, регулируя доставку кислорода тканям. Кроме того, взаимодействие NO с гемоглобином может изменять редокс-потенциал эритроцитов.

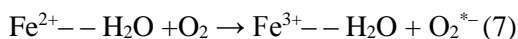
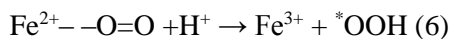
Показано, что гемоглобин может участвовать как в проокислительных реакциях с образованием АФК, так и выступать в роли гасителя последних [47]. Так, образование промежуточных оксиферрильной (Por-Fe<sup>4+</sup>=O) или пероксиферрильной (Por<sup>•+</sup>-Fe<sup>4+</sup>=O) форм гемоглобина с участием пероксида водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) приводит к антиоксидантной активности гемоглобина:



Интересно отметить, что восстановление феррильной формы (Por-Fe<sup>4+</sup>) гемоглобина может протекать с превращением нитрит-радикала (NO<sub>2</sub><sup>•</sup>) в нитрит, что также является антиокислительным эффектом гемоглобина [47]:



Одновременно, гемоглобин в процессе оксигенации/деоксигенации может участвовать в ряде проокислительных реакций. Так, при высоком напряжении O<sub>2</sub> оксигемоглобиновая связь протонируется, что может вести к окислению гема в трехвалентную форму и высвобождению пероксид-радикала (\*OOH), тогда как при низком pO<sub>2</sub> молекулы воды могут занимать кислород-лиганд в гемоглобине, а кратковременное взаимодействие с O<sub>2</sub> приводит к образованию супероксид-аниона (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, см. реакцию 7) [24]:

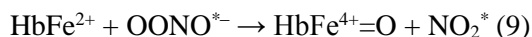


Кроме того, взаимодействие Por-Fe<sup>4+</sup>=O с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> также может стать источником супероксид-анион радикала (см. реакцию 8) [57]:



NO взаимодействует с O<sub>2</sub><sup>•-</sup> с образованием пероксинитрита (ONOO<sup>•-</sup>), который может быть не только сильным окислителем, повреждающим биомолекулы эритроцитарной мембраны, но и модификатором свойств гемоглобина. Так, в мембране эритроцитов, подвергшихся действию пероксинитрита, методом атомно-силовой микроскопии выявлены изменения микро- и

макроструктуры, что свидетельствует о нарушении механических свойств мембранной поверхности клеток и может лежать в основе изменения микроциркуляции при нитрозилирующем стрессе [6]. Однако основной мишенью пероксинитрита в эритроците является гемоглобин. Скорость взаимодействия  $\text{ONOO}^{*-}$  с  $\text{HbO}_2$  и  $\text{HHb}$  на три порядка выше, чем таковая у пероксида водорода [30]. В результате взаимодействия пероксинитрита с окси- или дезоксигемоглобином могут образовываться другие свободные радикалы ( $\text{NO}_2^*$ ,  $\text{O}_2^{*-}$ ,  $^*\text{OH}$ ) и метгемоглобин, потенцирующие окислительный стресс [57]. Вместе с тем, пероксинитрит окисляет гемоглобин через образование промежуточных феррильной ( $\text{Fe}^{4+=\text{O}}$ ) или перферрильной ( $\text{Por}^{*+}\text{-Fe}^{4+=\text{O}}$ ) форм гемоглобина, что можно рассматривать как реакции элиминации этого мощного окислителя [30].



Образовавшийся нитрит-анион, взаимодействуя с феррильной формой гемоглобина, может оказывать антиокислительный эффект, восстанавливая гемоглобин до трехвалентной формы, одновременно повышая активность енолазы эритроцитов путем нитрования тирозина 191 [47]. Таким образом, гемоглобин может обеспечивать защиту от пероксинитрита, выполняя функцию внутриклеточного антиоксиданта, что уменьшает вероятность образования его высоких концентраций и, следовательно, его повреждающего действия. Являясь источником нитритов, реакции взаимодействия  $\text{NO}$  с гемоглобином могут служить мощным фактором посттрансляционной модификации белков, активации/ингибирования внутриклеточных сигнальных каскадов, что изменяет функцию эффекторных тканей-мишеней данного газотрансмиттера [63]. Так, нитриты, участвуя в реакциях с дезоксигемоглобином, являются потенциальным региональным и системным вазодилататором, активатором апоптоза, ингибитором синтеза простациклина и т.д. [39, 63]. Существует определенная связь между СГК и процессами его аутоокисления и окислительной модификации [2]. Гемоглобин выступает в роли редокс-активного соединения, формируя псевдопероксидазный каталитический цикл, возникающий между  $\text{Fe}^{3+}$  и  $\text{Fe}^{4+}$  при поглощении гемоглобином  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Возможная роль кислородсвязывающих свойств крови в модифицировании механизмов клеточной сигнализации: недостаток кислорода ведет к изменению редокс-состояния гемоглобина ( $\text{HbFe}^{3+}$  и  $\text{HbFe}^{4+}$ ), что, в свою очередь увеличивает экспрессию таких протеинов, как фосфорилирование гипоксически индуцибельного фактора-1 $\alpha$  и гемоксигеназы [73]. Гемоглобин, регулируя содержание  $\text{NO}$  в том или ином регионе организма, формирует определенный уровень прооксидантно-антиоксидантного состояния. При нормальных физиологических условиях, когда количество образуемого  $\text{NO}$  невелико, прооксидантные эффекты пероксинитрита и  $\text{H}_2\text{O}_2$  угнетаются антиоксидантной функцией  $\text{NO}$ , а в условиях сдвига прооксидантно-антиоксидантного баланса, чрезмерного образования  $\text{O}_2^-$  и, соответственно, пероксинитрита и  $\text{H}_2\text{O}_2$  реализуется прооксидантный эффект  $\text{NO}$  [2].

Синдром ИРП сопровождается значительным окислительным стрессом, что может нарушать редокс-потенциал эритроцитов и менять кислородсвязывающие свойства крови [8]. Поскольку влияние  $\text{NO}$  на кислородсвязывающие свойства крови и прооксидантно-антиоксидантное состояние существенно зависят от условий среды и степени окислительного стресса, представляется важным изучение данных параметров во взаимосвязи на модели ИРП у экспериментальных животных в условиях инфузии донаторов оксида азота. В опытах на кроликах показано, что введение нитроглицерина или натрия нитропруссиды перед началом реперфузии способно существенно улучшать  $\text{NO}$ -синтазную функцию, прооксидантно-антиоксидантное и функциональное состояние печени при синдроме ишемии-реперфузии [8, 10]. Важно отметить, что коррекция окислительных повреждений донаторами  $\text{NO}$  при реперфузии печени сопровождалась улучшением параметров КТФ крови и повышением СГК крови, что могло быть следствием взаимодействия  $\text{NO}$  с гемоглобином [12, 16]. В данном случае показано, что экзогенный  $\text{NO}$  может выступать как трансмиссер системных антиоксидантных эффектов, реализуемых КТФ крови при ИРП. Кроме того на модели ИРП у крыс установлено, что протективный эффект мелатонина в значительной степени может быть опосредован  $\text{NO}$ -зависимыми механизмами [13].

Таким образом, несмотря на свою дуалистическую роль в процессах поддержания редокс-состояния клеток, при синдроме ИРП донаторы  $\text{NO}$  способствуют активации протективных механизмов, которые затрагивают систему транспорта кислорода и редокс-потенциал постишемической ткани печени.

**Монооксид углерода.** Вторым соединением, отнесенным к газотрансммитерам, является монооксид углерода – СО (угарный газ), который долгое время считался исключительно экзогенным токсическим веществом. Однако в 60-х годах XX века было показано, что СО образуется в организме человека в результате распада гемоглобина под воздействием фермента гемоксигеназы (ЕС:1.14.99.3), который способствует ферментативному распаду гема на билливердин, железо и СО [51]. Позднее установлено, что гемоксигеназа является широко распространенным и неотъемлемым клеточным ферментом для всех эукариот, использующих гемопротеины в аэробных процессах окисления [45]. На сегодняшний день установлено три типа гемоксигеназ: гемоксигеназа–1, –2 и –3. Первый тип обнаружен в большинстве органов и тканей млекопитающих, таких как печень, селезенка, поджелудочная железа, кишечник, почки, сердце, легкие, головной и спинной мозг, кожа, гладкомышечные и эндотелиальные клетки сосудов и др. [45, 52]. Данный фермент локализуется в клеточной мембране, кавеолах, эндоплазматическом ретикулуме, ядре и митохондриях, является индуцибельным и активируется под воздействием различных стрессоров, в том числе цитокинов, гипоксии, NO и АФК, обладает мощным антиоксидантным и противовоспалительным эффектами, что позволило отнести его к семейству белков теплового шока (*heat shock protein*) под номером 32 (*hsp*–32). В обычных условиях экспрессия гемоксигеназы–1 невелика, за исключением селезенки, где фермент участвует в утилизации гемоглобина отслуживших свой срок эритроцитов. Гемоксигеназа–2 является конституциональным ферментом большинства клеток, локализованным в митохондриях, имеет дополнительные активные центры для связывания гема и, возможно, участвует в регуляции многих клеточных функций [52, 75]. Наличие гемоксигеназы–3 у млекопитающих точно не установлено, в основном данный фермент используется растениями для синтеза хромофоров [29].

Установлено, что эндогенный СО способен оказывать нейротрансммитерный и вазодилатирующий эффекты, уменьшать агрегацию тромбоцитов, активировать фибринолиз, подавлять пролиферацию гладкомышечных клеток, фибробластов и Т-лимфоцитов, ингибировать апоптоз и синтез провоспалительных цитокинов, снижать экспрессию молекул межклеточной адгезии, что оказывает защитный эффект при такой патологии как атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, гипертензия, синдром ишемии–реперфузии [22, 51, 75]. Так, изопреналин (изадрин), известный  $\beta$ -адреномиметик, способный активировать гемоксигеназу–1 протеинкиназным путем, оказывал существенный защитный эффект на сердце при моделировании синдрома его ишемии–реперфузии у крыс, понижая концентрацию малонового диальдегида, экспрессию ИЛ–6 и TNF– $\alpha$  и восстанавливая активность супероксиддисмутазы (СОД, ЕС:1.15.1.1) [65]. Использование ингибитора гемоксигеназы–1 – цинк протопорфирина IX нивелировало эффект изопреналина в данных экспериментах. Известна способность СО при синдроме ишемии–реперфузии уменьшать экспрессию цитокинов, молекул межклеточной адгезии, индуцибельной NO–синтазы и циклоксигеназы–2 [45]. Показано, что СО усиливает выработку белков теплового шока 70 (*hsp*–70), повышает экспрессию ядерного эритроид–подобного фактора–2 (Nrf2), активность СОД [22]. Важно отметить, что *hsp*–70 является лигандом для толл–подобных рецепторов–2, регулирующих активность иммунного ответа и клеточной пролиферации [20].

Вместе с тем, эндогенная продукция СО сопровождается образованием эквимоллярных концентраций свободного железа (II), что в условиях окислительного стресса является мощным прооксидантным фактором [50]. Поэтому, экзогенные донаторы СО в настоящее время являются предпочтительнее эндогенных индукторов гемоксигеназы и относятся к классу перспективных терапевтических средств при патологии, сопровождающейся окислительным стрессом [27]. Установлено, что введение донаторов СО при гипотермическом хранении трансплантатов печени улучшает их жизнеспособность после пересадки органа у крыс [42]. Также показано, что донаторы СО при ИРП снижают активность каспаз, провоспалительных цитокинов и экспрессию молекул межклеточной адгезии на эндотелиальных клетках, что может уменьшать степень тяжести реперфузионных повреждений [66]. Возможно, механизм данного эффекта при ИРП обусловлен ингибированием триггерного сигнального каскада с толл–подобных рецепторов, в результате активации которого обычно усиливается экспрессия ядерного фактора каппа В (NF– $\kappa$ B) или клетки подвергаются апоптозу [37].

В целом, проведенные ранее исследования показали значительный цитопротективный эффект небольших концентраций экзогенного СО. Однако большинство исследователей сосредоточило свое внимание на внутриклеточных механизмах данного эффекта, не учитывая системные, и, в частности, высокий аффинитет СО к гемоглобину. Известно, что 80% эндогенного СО транспортируется в крови именно в связи с гемоглобином, что может существенно влиять на кислородсвязывающие свойства,

состояние которых определяет условия доставки кислорода тканям и их метаболизм, в том числе при патологии. В настоящее время установлено, что гемоксигеназа-2 является  $O_2$ -зависимым ферментом, благодаря структурным цистеинам в положении 265 и 282, и может изменять активность хеморецепторов рефлексогенных зон дуги аорты и синокаротидного синуса при понижении  $pO_2$  [31, 74]. Данный факт позволяет предположить, что использование донаторов CO может интегрировать клеточные и системные протективные механизмы при диксигических состояниях.

Влияние CO на окислительные повреждения при синдроме ИРП во взаимосвязи с оценкой состояния механизмов транспорта кислорода кровью было показано в ряде наших экспериментальных исследований. Установлено, что введение донатора CO повышает антиокислительную способность печени, снижает активность процессов ПОЛ, что способствует улучшению функционального состояния органа при ишемии-реперфузии [14]. Изучение параметров КТФ крови показало, что инфузия донатора CO перед началом реперфузионного периода способствует улучшению показателей кислотно-основного состояния, повышению СГК крови, а также частичной коррекции NO-синтазной функции [11]. Возможно, синергизм протективных эффектов двух газотрансмиттеров (CO и NO) в данном случае обуславливает улучшение редокс-потенциала тканей печени после ишемии.

**Сероводород.** Третьей молекулой, отнесенной к классу газотрансмиттеров, является  $H_2S$  – бесцветный газ со специфическим запахом [7]. С момента установления эндогенной продукции данного соединения в организме млекопитающих прошел не один десяток лет, пока точка зрения о нем как о побочном продукте биохимических реакций трансформировалась до биологически высоко активного соединения, участвующего в механизмах межклеточной сигнализации и модулирующего активность многих проадаптивных генов [7, 17, 69]. Установлено, что  $H_2S$  синтезируется практически во всех тканях, а наибольшие его концентрации обнаруживаются в мозге, сердце, сосудах, печени и почках. Биологическая активность  $H_2S$  впервые была показана в мозге, где установили его способность усиливать ответы с NMDA-рецепторов и долговременную потенциацию в нейронах гиппокампа [17]. В печени  $H_2S$  синтезируется из L-цистеина в основном под влиянием фермента цистатионин- $\gamma$ -лиазы (EC:4.4.1.1) [7]. У нокаутированных по данному ферменту мышей наблюдали развитие стойкой гипертензии, что позволило авторам подтвердить ранее дискутировавшуюся вазодилатационную функцию этого газа [71]. Кроме того, эндотелий может участвовать в регуляции сосудистого тонуса за счет изменения активности собственной цистатионин- $\gamma$ -лиазы [18].

Показано, что  $H_2S$  препятствует агрегации тромбоцитов, индуцированной АДФ, коллагеном, адреналином, тромбином и др., причем данный эффект не связан с генерацией цАМФ/цГМФ, продукцией NO или открытием  $K^+$ -зависимых каналов [51], однако, вероятно, опосредован антиоксидантной активностью низкомолекулярных тиолов и ингибированием интегриновых рецепторов  $\alpha_{IIb}\beta_3$  [33]. Сочетание свойств вазодилатора и антиагреганта способствовало развитию исследований данного газотрансмиттера, как перспективного соединения для коррекции сердечно-сосудистой патологии [56]. Выявлено, что как экзогенные доноры  $H_2S$ , так и стимуляция его эндогенной продукции, уменьшают зону инфаркта, степень окислительного стресса, повреждение митохондрий, апоптоз и аутофагию в сердце при ишемии-реперфузии у экспериментальных животных [61]. Установлено, что  $H_2S$  является эндогенным стимулятором ангиогенеза, что особенно важно при заживлении ран и адаптации к гипоксии [51]. Данный газотрансмиттер способен повышать чувствительность рецепторов к инсулину и уменьшать сосудистые повреждения почек при сахарном диабете 2-го типа, что указывает на его важную роль в углеводном обмене [70].

Большой интерес для исследователей представляют свойства  $H_2S$  оказывать цитопротекторный эффект на ткани и органы при патологии, связанной с развитием окислительного стресса. Механизм антиокислительного действия объясняют как прямым взаимодействием газа со свободными радикалами [43], так и косвенным эффектом, обусловленным влиянием на активность антиоксидантных ферментов и экспрессию их генов [69], снижением адгезии и миграции лейкоцитов в поврежденные ткани [62], модуляцией активности митохондрий и генерации ими АФК [48], восстановлением дисульфидных сшивок протеинов, подвергшихся свободнорадикальной атаке [56]. Установлено, что  $H_2S$  легко вступает в реакцию с активными формами как кислорода, так и азота, т.е. оказывает прямой антиоксидантный эффект, сравнимый с эффектами классических антиоксидантов цистеина и восстановленного глутатиона (GSH) [43]. При этом  $H_2S$  гасит свободные радикалы как химический восстановитель и может поддерживать NO-синтазную функцию эндотелия при окислительном стрессе [19, 69]. Так в системе гипоксантин-ксантиоксидаза наблюдали дозозависимое подавление генерации  $O_2^{\bullet-}$  при концентрациях  $H_2S$  от  $10^{-9}$  до  $10^{-4}$  моль [19].

Показано, что  $H_2S$  может влиять на функцию митохондрий, причем в малых концентрациях он выступает как донор электронов и улучшает работу комплекса IV (цитохромоксидазы C), а в больших – ингибирует его [48]. Более того, благодаря сульфгидрированию сигнального белка p66Shc в положении cysteine–59, он модулирует активность дыхательной цепи митохондрий, что препятствует «утечке» электронов и образованию АФК [69]. Кроме того,  $H_2S$  может увеличивать глутамат–зависимый транспорт цистеина в клетку и повышать уровень GSH, что также является механизмом антиоксидантной защиты митохондрий и в целом клетки от действия АФК [40]. В работе S. Shimada и соавторов показано увеличение уровня тиоредоксина под влиянием донатора  $H_2S$  – гидросульфида натрия (NaHS) при ИПП у мышей [62], что может быть еще одним механизмом антиоксидантного действия  $H_2S$  при патологии, сопровождающейся окислительным стрессом. Повышение уровня GSH и тиоредоксина в клетках под влиянием  $H_2S$  может происходить путем активации ядерного транскрипционного фактора Nrf2, который регулирует экспрессию антиоксидантных протеинов и защиту от окислительного стресса [69]. Nrf2 обычно находится в цитозоле в виде своего неактивного белкового предшественника Keap1, который высвобождает Nrf2 под влиянием вызванной  $H_2S$  сульфгидратацией цистеина–151 [72]. Фактор Nrf2 перемещается в ядро клетки и активирует транскрипцию антиоксидантных генов глутамат–цистеин лигазы, глутатион–редуктазы и тиоредоксина [62, 69]. Таким образом, под влиянием  $H_2S$  клетка способна повышать свой антиокислительный потенциал и сохранять устойчивость по отношению к окислительному стрессу.

$H_2S$  может взаимодействовать с металлосодержащими ферментами антиоксидантной системы и модулировать их активность. СОД, каталаза и глутатионредуктаза являются основными внутриклеточными антиоксидантными ферментами. Существует три формы СОД: цитоплазматическая Cu/ZnСОД, митохондриальная MnСОД и экстраклеточная СОД. СОД катализирует реакцию дисмутации  $O_2^{*-}$  в перекись водорода, которая затем подвергается распаду на кислород и воду под влиянием каталазы или глутатионпероксидазы. Показано, что  $H_2S$  взаимодействует с Cu/ZnСОД с высокой скоростью ( $>10^7 \text{ моль}^{-1} \text{ с}^{-1}$ ), повышая активность фермента [60]. Установлено, что  $H_2S$  повышает активность каталазы и СОД при моделировании ишемии–реперфузии культуры эндотелиальных клеток *bEnd.3* сосудов головного мозга [36]. Данное исследование показало, что цитопротекторный эффект сероводорода может быть связан с экспрессией сиртуина 6, который подавляет провоспалительные и проапоптотические эффекты ядерного фактора каппа В (NF–kB). Однако, как редокс чувствительный транскрипционный фактор, NF–kB способен регулировать активность клеточных антиоксидантных ферментов и может активироваться  $H_2S$  с помощью субстанции Р, что приводит к экспрессии генов глутатионпероксидазы и каталазы [69]. Однако последствия взаимодействия  $H_2S$  с NF–kB остаются до конца не изученными.

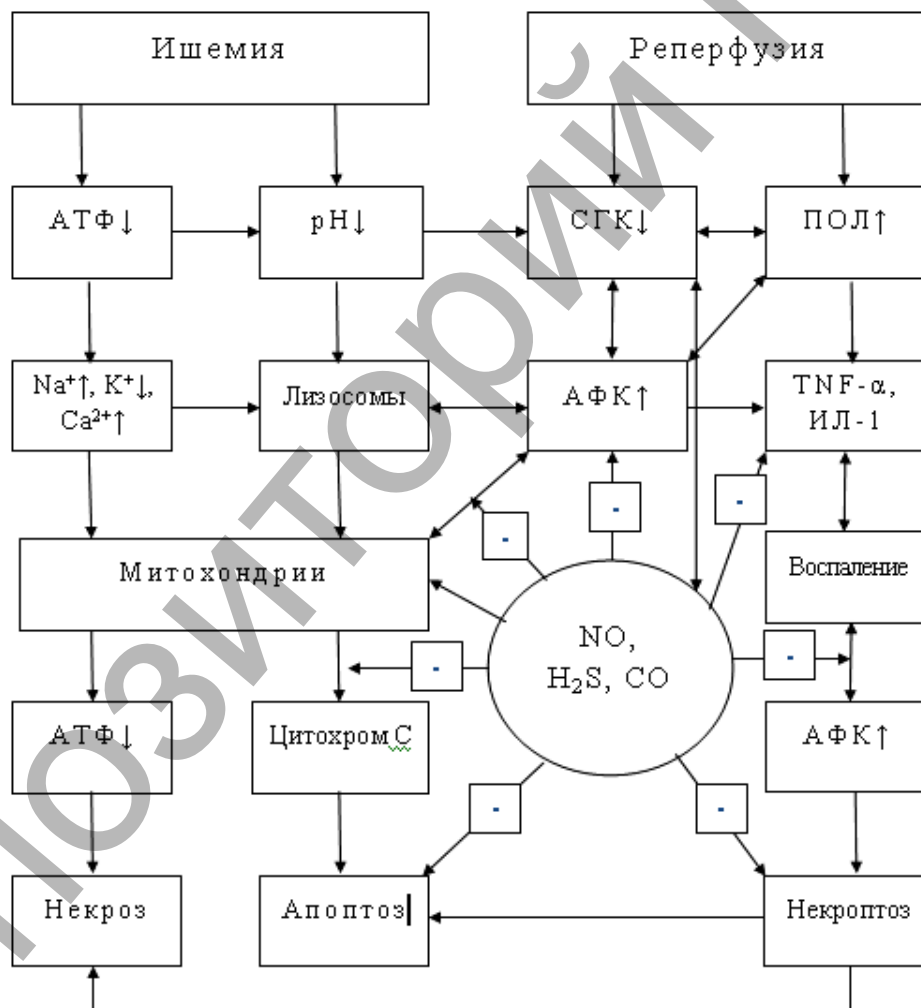
Показано, что  $H_2S$  путем активации NF–kB может оказывать провоспалительный эффект при остром панкреатите, сепсисе, ожоговой болезни и воспалительных заболеваниях суставов, что позволило авторам отнести данный газотрансмиттер к медиаторам воспаления [21]. Вместе с тем, установлена способность сероводорода ингибировать экспрессию NF–kB, TNF– $\alpha$ , индуцибельной NO–синтазы и повышать активность СОД, каталазы, глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы, глутатион–S–трансферазы, квинонредуктазы путем активации транскрипционного фактора Nrf2 для защиты клеток от окислительного стресса при моделировании гентамицин индуцированного повреждения почек [38]. Более того, показана способность  $H_2S$  ингибировать продукцию провоспалительных цитокинов (ИЛ–1, ИЛ–6, TNF– $\alpha$ ) в макрофагах при введении ЛПС [68]. Введение крысам NaHS (28 мкмоль/кг) при ИПП существенно снижает концентрацию NF–kB и реперфузионные повреждения печени [28].

Взаимодействие  $H_2S$  с мембранными рецепторами является физиологической основой многих оказываемых им эффектов, в том числе на тонус сосудов, агрегацию тромбоцитов, процессы энергообразования и метаболизма в клетке [55]. АТФ–чувствительные калиевые каналы ( $K_{ATP}$ –каналы) цитоплазматической и митохондриальных мембран являются важным компонентом клеточной сенсорики и регуляции внутриклеточного метаболизма. Взаимодействие  $H_2S$  с  $K_{ATP}$ –каналами приводит к гиперполяризации и расслаблению миокарда, что защищает сердце от перегрузок, ишемических и реперфузионных повреждений [59]. Активация и открытие  $K_{ATP}$ –каналов под влиянием  $H_2S$  обладает противовоспалительным эффектом [32], вызывает расслабление гладкой мускулатуры сосудов и вазорелаксацию [71]. Механизм активации  $K_{ATP}$ –каналов, по–видимому, связан с сульфгидрированием цистеина–43 в канал–формирующей субъединице Kir 6.1 [49]. В передаче вазодилатирующего эффекта  $H_2S$  на гладкую мускулатуру сосудов могут участвовать и



кальций–зависимые калиевые каналы ( $K_{Ca}$ -каналы) [55, 71]. Более того, активация  $K_{Ca}$ -каналов сероводородом оказывает определенный эффект на хеморецепторы дуги аорты и каротидных рефлексогенных зон, которые схожи с гипоксическим воздействием [31]. При этом, модулятором активности цистатионин- $\gamma$ -лиазы в хеморецепторах выступает монооксид углерода, образующийся при участии гемоксигеназы-2.

Известна способность  $H_2S$  влиять на клеточную пролиферацию [7, 62]. Установлено, что при ИРП  $H_2S$  снижает степень апоптоза, повышает активность внутриклеточных антиоксидантов, индуцирует продукцию белков теплового шока (hsp-90), ингибирует провоспалительные факторы, что способствует уменьшению реперфузионных повреждений органа [62]. Вместе с тем известно, что, взаимодействуя с гемоглобином,  $H_2S$  образует сульфгемоглобин и метгемоглобин [58]. Метгемоглобин не может присоединять кислород и повышает сродство нормального гемоглобина к кислороду [25]. Более того, взаимодействие сероводорода с гемом и образование сульфгемоглобина можно рассматривать как формирование внутрисосудистого пула данного газотрансмиттера с возможностью его транспортировки на значительные расстояния от мест образования. Предполагается участие газотрансмиттеров (системы L-аргинин-NO, сероводорода) в формировании функциональных свойств гемоглобина путем модификации его сродства к кислороду через системные и регионарные, внутриэритроцитарные механизмы регуляции, что имеет значение в патогенезе гипоксических состояний, дисфункции эндотелия, окислительного стресса организма и для их коррекции [3].



**Рис.** Участие газотрансмиттеров в кислородзависимых механизмах реперфузионных повреждений печени, где СГК – сродство гемоглобина к кислороду, АФК – активные формы кислорода, ПОЛ – перекисное окисление липидов, TNF- $\alpha$  – фактор некроза опухолей-альфа, ИЛ-1 – интерлейкин-1

В наших опытах на крысах изучили влияние донатора сероводорода (NaHS) на состояние КТФ крови при ИРП. Установлено, что однократная инфузия NaHS (14 мкмоль/кг, за 5 мин до реперфузии)



улучшает параметры транспорта кислорода кровью, повышает СГК в крови, снижает активность трансаминаз крови, восстанавливает уровень сероводорода в плазме в конце реперфузионного периода у экспериментальных животных [9]. Кроме того, показано, что протективный эффект эритропоэтина частично обусловлен активацией эндогенной продукции данного газотрансмиттера и сопровождается схожими изменениями КТФ крови [15]. По-видимому, все газотрансмиттеры вносят определенный вклад в модификацию СГК и тем самым участвуют в патогенезе окислительного стресса, что достигается через различные механизмы: образование дериватов гемоглобина (нитрозогемоглобин, нитрозилгемоглобин, метгемоглобин, сульфгемоглобин), модулирование внутриэритроцитарной системы антиоксидантной активности гемоглобина и кислородсвязывающих свойств крови [1], а также опосредованно через системные механизмы формирования функциональных свойств гемоглобина, обусловленные изменением метаболизма и редокс-состояния тканей при гипоксии (рисунок).

Таким образом, комплексное изучение влияния NO, CO и H<sub>2</sub>S на параметры кислородтранспортной функции крови, прооксидантно-антиоксидантный баланса и функциональное состояние печени при ишемии-реперфузии выявило новые свойства, обеспечивающие протективный эффект данных газотрансмиттеров. Данные свойства обусловлены как селективным, так и синергичным эффектом газотрансмиттеров на системные механизмы транспорта кислорода, обеспечивающие оптимальные параметры сродства гемоглобина к кислороду и регуляцию кислородзависимых процессов в клетках печени в постишемическом состоянии, что улучшает их редокс-состояние и препятствует развитию реперфузионных повреждений.

### Литература:

- [1]. Зинчук В. В. // Новости медико-биологических наук. 2016. Т. 14, № 4. С. 55–63.
- [2]. Зинчук В. В., Глуткина Н. В. // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2013. Т. 99. С. 537–554.
- [3]. Зинчук В. В., Лепеев В. О., Гуляй И. Э. // Росс. физиол. журнал им. И.М. Сеченова. 2016. Т. 102. С. 1176–1184.
- [4]. Зинчук В. В., Ходосовский М. Н. // Успехи физиол. наук. 2006. Т. 37, № 4. С. 45–56.
- [5]. Руммо, О. О. // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2015. Т. 17, № 2. С. 100–104.
- [6]. Стародубцева М. Н., Кузнецова Т. Г., Кузнецова Т. А. // Вести НАН Беларуси. Сер. биол. наук. 2006. № 3. С. 90–93.
- [7]. Улащик В. С. // Здоровоохранение. 2012. № 1. С. 42–48.
- [8]. Ходосовский М. Н. // Весці НАН Беларусі. Сер. мед. навук. 2008. № 3. С. 23–27.
- [9]. Ходосовский М. Н. // Росс. физиол. журнал им. И.М. Сеченова. 2016. Т. 102. С. 698–704.
- [10]. Ходосовский М. Н., Зинчук В. В. // Бюлл. эксперим. биологии и медицины. 2006. Т. 142. С. 631–634.
- [11]. Ходосовский М. Н., Зинчук В. В. // Патогенез. 2016. Т. 14, № 1. С. 57–61.
- [12]. Ходосовский М. Н., Зинчук В. В. // Росс. физиол. журнал им. И.М. Сеченова. 2012. Т. 98. С. 610–617.
- [13]. Ходосовский М. Н., Зинчук В. В. // Эксперим. и клин. фармакол. 2014. Т. 77, № 6. – С. 33–38.
- [14]. Ходосовский М. Н., Зинчук В. В., Гуляй И. Э. // Росс. физиол. журнал им. И. М. Сеченова. 2015. Т. 101. С. 1150–1157.
- [15]. Ходосовский М. Н., Зинчук В. В., Гуляй И. Э. // Журн. Гродненского гос. мед. университета. 2017. № 1. С. 57–61.
- [16]. Ходосовский М. Н., Зинчук В. В. // Журн. Гродненского гос. мед. университета. 2007. № 2. С. 20–22.
- [17]. Abe K., Kimura H. // J. Neurosci. 1996. Vol. 16. P. 1066–1071.
- [18]. Al-Magableh M. R., Hart J. L. // Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 2011. Vol. 383. P. 403–413.
- [19]. Al-Magableh M. R., Kemp-Harper B. K., Ng H. H. et al. // Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 2014. Vol. 387. P. 67–74.
- [20]. Asea A. // Handb. Exp. Pharmacol. 2008. Vol. 183. P. 111–127.
- [21]. Bhatia M. // Methods Enzymol. 2015. Vol. 555. P. 195–205.
- [22]. Bolisetty S., Zarjou A., Agarwal A. // Am. J. Kidney Dis. 2017. Vol. 69. P. 531–545.
- [23]. Bolondi G., Mocchegiani F., Montalti R. et al. // World J. Gastroenterol. 2016. Vol. 22. P. 5936–5949.
- [24]. Bonaventura C., Henkens R., Alayash A. I. et al. // Antioxid. Redox Signal. 2013. Vol. 18. P. 2298–2313.
- [25]. Brown C., Bowling M. // J. Bronchology Interv. Pulmonol. 2013. Vol. 20. P. 241–246.
- [26]. Carvalho F. A., Maria A. V., Braz Nogueira J. M. et al. // Clin. Hemorheol. Microcirc. 2006. Vol. 35. P. 341–347.
- [27]. Cebova M., Košútová M., Pecháňová O. // Physiol. Res. 2016. Vol. 65. P. S291–S307.
- [28]. Chen Y., Liu Z., Xie X. // J. Surg. Res. 2010. Vol. 164. P. e305–e313.
- [29]. Emborg T. J., Walker J. M., Noh B., Vierstra R. D. // Plant Physiol. 2006. Vol. 140. P. 856–868.
- [30]. Exner M., Herold S. // Chem. Res. Toxicol. 2000. Vol. 13. P. 287–293.
- [31]. Fandrey J. // Sci. Signal. 2015. Vol. 8, N 373. pp. fs10.
- [32]. Gade A. R., Kang M., Akbarali H. I. // Mol. Pharmacol. 2013. Vol. 83. P. 294–306.
- [33]. Gao L., Cheng C., Sparatore A et al. // Heart Lung Circ. 2015. Vol. 24. P. 77–85.
- [34]. Grau M., Lauten A., Hoepfener S. et al. // Clin. Hemorheol. Microcirc. 2016. Vol. 63. P. 199–215.
- [35]. Guan L. Y., Fu P. Y., Li P. D. et al. // World J. Gastrointest. Surg. 2014. Vol. 6, N 7. P. 122–128.

- [36]. Hu Y., Li R., Yang H. et al. // J. Stroke Cerebrovasc. Dis. 2015. Vol. 24. P. 601–609.
- [37]. Huang H. F., Zeng Z., Wang K. H. et al. // World J. Gastroenterol. 2015. Vol. 21. P. 2937–2948.
- [38]. Kalayarasan S., Prabhu P. N., Sriram N. et al. // Eur. J. Pharmacol. 2009. Vol. 606. P. 162–171.
- [39]. Kim-Shapiro D. B., Gladwin M. T. // Nitric Oxide. 2014. Vol. 38. P. 58–68.
- [40]. Kimura Y., Goto Y., Kimura H. // Antioxid. Redox Signal. 2010. Vol. 12. P. 1–13.
- [41]. Kleinbongard P., Schulz R., Rassaf T. et al. // Blood. 2006. Vol. 107. P. 2943–2951.
- [42]. Lee L. Y., Kaizu T., Toyokawa H. et al. // Liver Transpl. 2011. Vol. 17. P. 1457–1466.
- [43]. Li Q., Lancaster J. R. Jr. // Nitric Oxide. 2013. Vol. 35. P. 21–34.
- [44]. Li J., Li R. J., Lv G. Y., Liu H. Q. // Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. 2015. Vol. 19. P. 2036–2047.
- [45]. Liu B., Qian J. M. // Int. J. Clin. Exp. Med. 2015. Vol. 8. P. 19867–19873.
- [46]. Ludolph B., Bloch W., Kelm M. et al. // Vasc. Health. Risk. Manag. 2007. Vol. 3. P. 1069–1073.
- [47]. Lu N., Chen C., He Y. et al. // Nitric Oxide. 2014. Vol. 40. P. 1–9.
- [48]. Módos K., Bos E. M., Calzia E. et al. // Br. J. Pharmacol. 2014. Vol. 171. P. 2123–2146.
- [49]. Mustafa A. K., Sikka G., Gazi S. K. et al. // Circ. Res. 2011. Vol. 109. P. 1259–1268.
- [50]. Niu X., Huang W. H., De Boer B. et al. // Liver Transpl. 2014. Vol. 20. P. 904–911.
- [51]. Olas B. // Clin. Chim. Acta. 2015. Vol. 20. P. 115–121.
- [52]. Origassa C. S., Câmara N. O. // World J. Hepatol. 2013. Vol. 5. P. 541–549.
- [53]. Özüyan B., Grau M., Kelm M. et al. // Trends Mol. Med. 2008. Vol. 14. P. 314–322.
- [54]. Pawloski J. R., Hess D. T., Stamler J. S. // Nature. 2001. Vol. 409. P. 622–626.
- [55]. Peers C., Bauer C. C., Boyle J. P. et al. // Antioxid. Redox Signal. 2012. Vol. 17. P. 95–105.
- [56]. Polhemus D. J., Lefter D. J. // Circ. Res. 2014. Vol. 114. P. 730–737.
- [57]. Rifkind J. M., Nagababu E. // Antioxid. Redox Signal. 2013. Vol. 18. P. 2274–2283.
- [58]. Saeedi A., Najibi A., Mohammadi-Bardbori A. // Int. J. Occup. Environ. Med. 2015. Vol. 6, N 1. P. 20–25.
- [59]. Salloum F. N. // Pharmacol. Ther. 2015. Vol. 152. P. 11–17.
- [60]. Searcy D. G., Whitehead J. P., Maroney M. J. // Arch. Biochem. Biophys. 1995. Vol. 318. P. 251–263.
- [61]. Shen Y., Shen Z., Luo S. et al. // Oxid. Med. Cell. Longev. 2015. Vol. 2015. ID. 925167. P. 1–13.
- [62]. Shimada S., Fukai M., Wakayama K. et al. // Surg. Today. 2015. Vol. 45. P. 892–903.
- [63]. Speckmann B., Steinbrenner H., Grune T., Klotz L. O. // Arch. Biochem. Biophys. 2016. Vol. 595. P. 153–160.
- [64]. Suhr F., Brenig J., Müller R. et al. // PLoS One. 2012. Vol. 7. pp. e45982.
- [65]. Wang J., Hu X., Fu W. et al. // Mol. Med. Rep. 2014. Vol. 9. P. 1863–1868.
- [66]. Wei Y., Chen P., de Bruyn M. et al. // BMC Gastroenterol. 2010. Vol. 10, No 42. P. 1–9.
- [67]. Weinberg J. A., Patel R. P. // Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol. 2016. Vol. 30. P. 491–498.
- [68]. Whiteman M., Li L., Rose P. et al. // Antioxid. Redox Signal. 2010. Vol. 12. P. 1147–1154.
- [69]. Xie Z. Z., Liu Y., Bian J. S. // Oxid. Med. Cell. Longev. 2016. Vol. 2016, ID 6043038. P. 1–12.
- [70]. Xue R., Hao D. D., Sun J. P. et al. // Antioxid. Redox Signal. 2013. Vol. 19. P. 5–23.
- [71]. Yang G., Wu L., Jiang B. et al. // Science. 2008. Vol. 322. P. 587–590.
- [72]. Yang G., Zhao K., Ju Y. et al. // Antioxid. Redox Signal. 2013. Vol. 18. P. 1906–1919.
- [73]. Yeh L. H., Alayash A. I. // J. Intern. Med. 2003. Vol. 253. P. 518–526.
- [74]. Yuan G., Vasavda C., Peng Y. J. et al. // Sci. Signal. 2015. Vol. 8, No 373. pp. ra37.
- [75]. Zakhary R., Gaine S. P., Dinerman J. L. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. Vol. 93. P. 795–798.

Поступила в редакцию: 05.05.2017 г.

M. N. KHODOSOVSKY, V. V. ZINCHUK

## PARTICIPATION OF GASOTRANSMITTERS IN OXYGEN-DEPENDENT PROCESSES DURING HEPATIC ISCHEMIA-REPERFUSION SYNDROME

Grondo State Medical University

### Summary

Hepatic ischemia-reperfusion (HIR) injury is the major cause of early organ dysfunction and mortality in clinical practice after liver resection or transplantation. Oxidative stress, blood gas transport disorders, inflammation, mitochondria dysfunction, apoptosis and necrosis are main pathophysiological mechanisms of HIR injury. Hydrogen sulfide, carbon monoxide and nitric monoxide are the three gaseous signaling molecules, which exert wide effects on blood gas transport, mitochondria respiration, inflammatory and apoptotic processes during HIR. The goal of this review was to analyze our and recent literature findings regarding the gasotransmitters role in HIR injury.

**Keywords:** gasotransmitters, oxygen, hemoglobin, liver, ischemia-reperfusion